

Cookson型誘導体化試薬を用いるビタミンDの高速液体クロマトグラフィー

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 島田, 和武, 東, 達也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/3898

総合論文*

Cookson 型誘導体化試薬を用いるビタミン D の高速液体クロマトグラフィー/質量分析

島田 和武^{®**}, 東 達也^{**}

High-performance liquid chromatography/mass spectrometry of vitamin D compounds employing derivatization with Cookson-type reagents

Kazutake SHIMADA and Tatsuya HIGASHI^{**}

^{**}Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa 920-0934

(Received 14 March 2002, Accepted 4 April 2002)

The usefulness of derivatization with Cookson-type reagents (4-substituted-1,2,4-triazoline-3,5-dione) in the high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) of vitamin D (D) compounds was examined. A Cookson-type reagent selectively, rapidly and quantitatively reacted with the *s*-cis-diene of the D compound to form a Diels-Alder adduct. Glucuronidated and sulfated vitamin D₃ (D₃) metabolites were converted to the adducts with 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione, which gave a characteristic product ion indicating the conjugation position by positive-electrospray-MS/MS/MS. Using this technique, we identified 3-*epi*-24,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-glucuronide together with four other conjugated metabolites in the bile of rats administered 24,25-dihydroxyvitamin D₃. This was one of the first reported instances involving the epimerization of the 3-hydroxy group of D compounds. The derivatization with Cookson-type reagents also significantly increased the detection responses of D compounds in positive-atmospheric pressure chemical ionization-MS. Among several Cookson-type reagents, 4-[2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalyl)ethyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione was most effective in improving the ionization efficiencies of the resulting derivatives. A stable isotope dilution LC/MS/MS method for the determination of plasma 1 α -hydroxyvitamin D₃ [1 α (OH)D₃], a prodrug of an active form of D₃, was developed employing this derivatization and the additional usual acetylation, in which the limit of quantitation was 25 pg/ml for a 1.0 ml plasma aliquot. Using the developed method, we measured its plasma concentration of a subject orally given 1 α (OH)D₃ (4 μ g). In conclusion, derivatization with Cookson-type reagents was very useful in the LC/MS analysis of D compounds not only to characterize the structure, but also to increase the detection response.

Keywords : vitamin D; liquid chromatography/mass spectrometry; derivatization with Cookson-type reagent; structural elucidation; quantitative analysis.

1 緒 言

ビタミン D (D) は '抗くる病因子' として発見された脂溶性ビタミンであるが、活性型代謝物は核内の D 受容体 (VDR) を介して生体内カルシウムを調節するステロ

イドホルモンの一つとしてとらえられている。D には 17 β 位側鎖構造の異なるビタミン D₂~D₇ が知られているが、ヒトにおいて主要なものはビタミン D₃ (D₃) である。皮膚で 7-デヒドロコレステロールから生合成あるいは食物として摂取された D₃ は、まず肝で 25-ヒドロキシビタミン D₃ [25(OH)D₃] に代謝され、血中の D 結合タンパク (DBP) と結合して体内を循環する。25(OH)D₃ は血清カ

* 東北支部創立 50 周年記念

** 金沢大学薬学部: 920-0934 石川県金沢市宝町 13-1

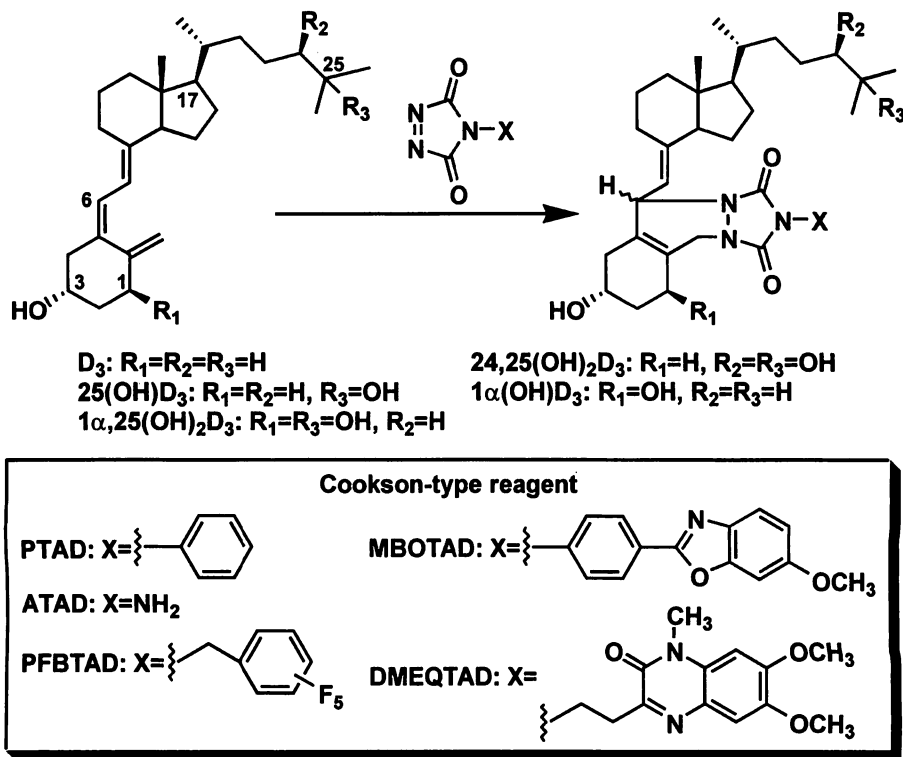


Fig. 1 Derivatization of D₃ compounds with Cookson-type reagents

ルシウム濃度が正常値 (90~100 mg/l) 以下になるとじん (腎) でその 1α 位に水酸化を受け、活性型 D₃ である 1α,25-ジヒドロキシビタミン D₃ [1α,25(OH)₂D₃] に変換される。一方、血清カルシウム濃度が回復すると 1α 位への水酸化は抑制され、25(OH)D₃ は主として 24R,25-ジヒドロキシビタミン D₃ [24,25(OH)₂D₃] に代謝される (Fig. 1)。

血中 25(OH)D₃ の測定は D の供給状態の指標として、1α,25(OH)₂D₃ のそれは、D 代謝異常を伴う各種疾患の鑑別診断上重要である。さらに 1α,25(OH)₂D₃ 及びその合成アナログは、D 代謝異常性骨疾患治療薬だけでなく免疫調節薬、抗がん剤などとして、また 24,25(OH)₂D₃ は新規骨粗しょう (鬆) 症治療薬としてその体内動態の解明が新薬の開発上重要な課題となっている。D 代謝物の血中レベルは著しく低い上 (ng~pg/ml オーダー)、各構造は互いに酷似しており、その分析には極めて高い感度と選択性が要求される。従来 D 代謝物は、VDR や DBP を結合タンパクとする競合アッセイ、免疫化学測定法、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及びガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) などを駆使して測定されてきたが^{1)~3)}、これらの方法はいずれも一長一短を有し必ずしも完成されたものではない。一方、高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) は優れたイオン化法 [エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI)、大

気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) など] の開発に伴い、D 分析の分野においても重要な手段となりつつある。すなわち、D 化合物は熱に不安定で GC/MS では熱異性化を伴うため、LC/MS による分析のほうが有用であると期待される。しかし、D 化合物の各種イオン化法におけるイオン化効率が一般に低く、一部の合成アナログ^{4)~6)}を除いては十分な感度が得られていない。また、代謝物の同定に際しても、イオン化法がソフトであるため GC/電子イオン化 (EI)-MS に比べ、期待したほどの構造情報が得られないなどの欠点も有している⁷⁾。これらの点の改善を目的として、マイクロ LC やタンデム質量分析法 (MS/MS, MSⁿ) の導入などハード面の工夫もなされているが十分とは言えない。一方、LC/MS にも GC/MS や HPLC と同様に、誘導体化を導入するとき、高感度、高度な構造情報が得られることが期待される。

4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン (4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione, PTAD) 及びその 4 位アナログ (Cookson 型試薬) は、D 化合物の s-シス-ジエンと選択的に反応し、安定な Diels-Alder 付加体を生成する (Fig. 1)。これまで本試薬は蛍光検出 HPLC 用プレラベル化試薬の開発を中心として研究されてきたが⁸⁾⁹⁾、最近、LC/MS 用誘導体化試薬としての有用性が注目を集めている。なお、本誘導体化反応では試薬が D 化合物の α, β の両面から攻

撃するため 6 位のエピマーが生成するが、このことは長所とも短所とも成り得る。すなわち、クロマトグラム上ツインピークが出現し実質的な感度の面からは不利であるが、その生成比は基質及び反応条件により一定であり、分析対象を両エピマーの保持時間とピーク比から確実に同定することができる。

以上の観点から本研究では、D 化合物の LC/MS 分析における Cookson 型試薬の有用性を、構造解析及び高感度定量分析の両面から検討した。

2 実 験

LC/MSⁿ はイオントラップ型 LC/MSⁿ, ThermoQuest LCQ に Jasco PU-980 クロマトグラフを接続して使用した。4[2-(6,7-ジメトキシ-4-メチル-3-オキソ-3,4-ジヒドロキノキサリル)エチル]-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン {4-[2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalyl)ethyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione: DMEQTAD} は和光純薬製を購入し、その他の Cookson 型試薬は当研究室で合成した。D 化合物と Cookson 型試薬との反応は、酢酸エチル中、室温、1.5 時間で行い、過剰の試薬をエタノールで分解後、溶媒を留去し、移動相に溶解して LC/MSⁿ に付した。

3 結果及び考察

3.1 構造解析を指向した誘導体化と D₃ の新規代謝経路の解明

3.1.1 構造解析を指向した誘導体化 D に限らずステロイド、薬物などは、一般に第 1 相反応（水酸化など）後、グルクロン酸抱合、硫酸抱合などの第 2 相反応を受けて排せつされる。近年 D 代謝物の第 2 相反応生成物の存在が明らかにされるに至り、生理作用及び臨床上的測定意義などが注目されている²⁾。これら第 2 相反応生成物は、高極性な上に遊離型代謝物に増して不安定であり、その分析には LC/MS が好適である。本法は水解を必要としないため、抱合に関する情報が得られる利点も有している。

著者らは、新規骨粗鬆症治療薬として期待されている 24,25(OH)₂D₃ の代謝経路を明らかとする目的で、本化合物を Wistar 系ラットに経口投与後、その胆汁中の第 2 相反応生成物の検索を行った。まず、予想代謝物である 24,25(OH)₂D₃ モノグルクロニドの位置異性体 3 種を合成し、これら標品を指標として分析したところ、3- 及び 24-グルクロニドが約 1 : 4 の比で生成していること、25(OH)D₃ とは異なり 25 位は *in vivo* では抱合を受けないことが明らかとなった¹⁰⁾。同定はイオン性化合物に有利な LC/ESI-MSⁿ で行ったが {カラム: Develosil ODS HG-5 (150 × 2.0 mm i.d.), 移動相: アセトニトリル-10 mM AcONH₄ (1 : 2), 流量: 0.25 ml/min}、これら代謝物は負イオン検出では脱プロトン化分子イオン [M - H]⁻ を、

一方、正イオン検出においてはアンモニア付加イオン [M + NH₄]⁺ を与えた。さらに正イオンモードでアンモニア付加イオンをプリカーサーイオンとする MS/MS を試みたところ、プロトン化分子イオンのほかに脱水イオン及びゲニン部に対応するイオンが観察され、同定上有用であった。なお、D 代謝物のグルクロニドは正イオンモードに比べ負イオンモードで高感度に測定されるが、MS/MS でプロダクトイオンを与えず、後者は構造解析には不向きであった。

ところで、生体内にはこれらグルクロニド以外にも、標品の得にくい微量第 2 相反応生成物の存在が予想された。例えば、次節で述べるように、本胆汁中にもこのような未知代謝物の存在が示唆された。そして、このような代謝物の同定には、より高度な構造情報を提供する分析法の開発が必要である。先述のように LC/MS では用いられるイオン化法がソフトイオン化法であるため、MSⁿ を用いたとしても GC/EI-MS などに比べフラグメントイオン（プロダクトイオン）の生成は極めて少ない。言い換えれば、LC/MS におけるフラグメンテーションは通常、脱水や炭素-ヘテロ原子結合の切断に限局され、炭素-炭素結合の開裂はほとんど認められない。24,25(OH)₂D₃ モノグルクロニドの分析では、上記 LC 条件で位置異性体 3 種は良好に分離され（保持時間、3-グルクロニド: 6.8 分、24-グルクロニド: 12.2 分、25-グルクロニド: 11.0 分）、同定が可能であったが、それら相互のプロダクトイオンマスペクトルに本質的な違いは認められなかった。すなわち、標品がない場合には LC/MSⁿ のみで位置異性体を識別することは困難である。

そこで、誘導体化を LC/MS に導入しこの問題の解決を試みた。ESI-MSⁿ では、高速原子衝撃 (fast atom bombardment)-MSⁿ で観察されるチャージリモートフラグメンテーション (charge-remote fragmentation) は認められず、電荷や不対電子の存在に起因する開裂、いわゆるチャージメデイエイテッドフラグメンテーション (charge-mediated fragmentation) が起こる。これに従えば、Cookson 型試薬により D 骨格の中心付近に窒素原子を導入すれば、その不対電子の作用により代謝部位の決定に有益なフラグメンテーションが起こる可能性がある。そこでまず、24,25(OH)₂D₃ 3- 及び 24-グルクロニドをモデル化合物に用い、PTAD 付加体に導いたところ、正イオンモードの MS/MS/MS において D 骨格の C6-7 結合の切断による A 環側のプロダクトイオンが観察され、期待どおり抱合位置に関する情報が得られた (Fig. 2)¹¹⁾。すなわち、グルクロン酸抱合が A 環上である場合には *m/z* 474 のイオンが、一方側鎖上である場合には *m/z* 298 のイオンのみが観察された。側鎖上の抱合位置は 2 級水酸基 (24 位) が常法でアセチル化されるのに対し、25 位のそれは (3

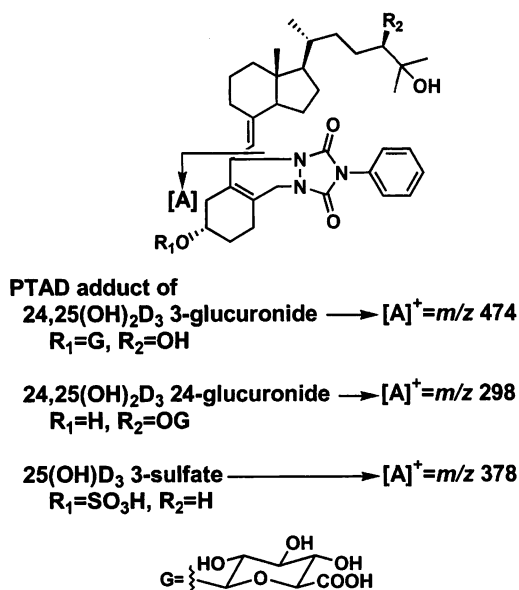


Fig. 2 Characteristic product ions of PTAD adducts of conjugated D₃ metabolites in LC/ESI-MS/MS/MS

級水酸基)は反応を受けないことを利用して識別可能であった。さらに25(OH)D₃ 3-サルフェートにおいては硫酸基のpK_aが非常に小さいため、そのままでは正イオンモードでは検出できなかったが、PTAD付加体により、強度は弱いながらも分子量関連イオンが検出され、同様にMS/MS/MSによって抱合位置及び硫酸基の確認が可能となった。このように抱合型D代謝物をPTAD付加体に導き、正イオン検出のMS/MS/MSに付すこと及びアセチル化を駆使してその抱合部位を決定できることを見いだした。

3・1・2 D₃の新規代謝経路の解明 以上の知見を基に、先に述べた24,25(OH)₂D₃投与ラット胆汁中の未知代謝物の分析を行った¹²⁾。まず、胆汁試料を逆相系固相抽出カートリッジ及び疎水性陰イオン交換クロマトグラフィーで精製し、24,25(OH)₂D₃ 3-及び24-グルクロニドのほか、ホトダイオードアレイUV検出器でD骨格に特徴的なスペクトル(極大波長:約265 nm, 極小波長:約230 nm)を示す3代謝物を単離した。それらの中の一つはクロマトグラフ的挙動が24,25(OH)₂D₃ 24-グルクロニドと異なるものの、正、負両イオンモードのLC/ESI-MSⁿにおいて同様のスペクトルを与え、ジヒドロキシ型D₃代謝物のモノグルクロニドであることが判明した。次いで本代謝物をβ-グルクロニダーゼ水解に付し、遊離したゲニンをトリメチルシリル(TMS)化後、GC/EI-MSによりその構造解析を試みたところ、マススペクトルは24,25(OH)₂D₃-TMS誘導體と一致したが保持時間が大きく異なり、本ゲニンは24,25(OH)₂D₃の立体異性体である可能性が示唆された。さらにプロトン核磁気共鳴においては3位プロトンの化

学シフトのみが24,25(OH)₂D₃のそれと異なり、3位エピマーと推測された。そこで、3-エピ-24,25-ジヒドロキシビタミンD₃ [3-epi-24,25(OH)₂D₃]を合成し、HPLCのクロマトグラフ的挙動の比較より同定した。なお、24,25(OH)₂D₃と3-epi-24,25(OH)₂D₃の分離は通常の順相及び逆相HPLCでは困難であったが、後者の移動相にγ-シクロデキストリンを添加する包接HPLCにより良好に分離可能であった¹³⁾。次いで、先に述べたPTAD化及びアセチル化後のLC/ESI-MSⁿにより抱合位置を24位と決定した。以上のようにして本代謝物を3-epi-24,25(OH)₂D₃ 24-グルクロニドと同定したが、本代謝物は胆汁中の主成分体であり、3位が異性化したD代謝物の最初の同定例の一つである。また、残る2種の代謝物についても、同様の手法を用い23,25-ジヒドロキシ-24-オキシビタミンD₃ [23,25(OH)₂-24-oxo-D₃] 23-グルクロニド及び24,25(OH)₂D₃ 3-サルフェートと同定した。このように標品が得られない場合でも、LC/MSⁿのソフト面の工夫により代謝物の構造決定が可能であり、24,25(OH)₂D₃は直接グルクロン酸抱合及び硫酸抱合を受けるとともに、側鎖の酸化や3位水酸基の異性化を経て抱合を受けることを明らかとした(Fig. 3)。

さらに著者らは、25(OH)D₃¹⁴⁾及び24,25(OH)₂D₃¹³⁾を投与したラットの血中に、遊離型の3-epi-24,25(OH)₂D₃が主代謝物として存在することも明らかとした。この際も生成物をPTAD付加体に導き、LC/APCI-MSⁿによって同定を確実なものとした。また、[3α-³H]-24,25(OH)₂D₃を合成し、LC/APCI-MSを利用して3位異性化の機構を検討したところ、本反応は肝のサイトゾル画分に存在する酵素により触媒され、3-オキシ体を経由することが判明した¹³⁾。現在、3位異性化はD₃の普遍的な代謝経路の一つであることが確認され、その役割は標的細胞におけるD₃代謝物の活性調節にあると考えられている¹⁵⁾。

なお、著者らは4-アミノ-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン(4-amino-1,2,4-triazoline-3,5-dione: ATAD, Fig. 1)がC6-7間の炭素-炭素結合を効率的に切断することも見いだし、現在本試薬のD化合物の構造解析への適用を検討中である。また、最近Weiskopfらにより、PTADを用いた活性型D₃アナログのESI-MSⁿによる構造解析の例も報告されている¹⁶⁾。

3・2 高感度検出指向の誘導體化と活性型D₃製剤の血中濃度測定

3・2・1 Cookson型試薬のLC/MS定量分析への適用

上述のように、一般にD化合物はLC/MSに用いられる種々のイオン化法において十分なイオン量が得られない。このため、Cookson型試薬を高感度化のためのLC/MS誘導體化試薬として用いる報告もなされている。Yeungら

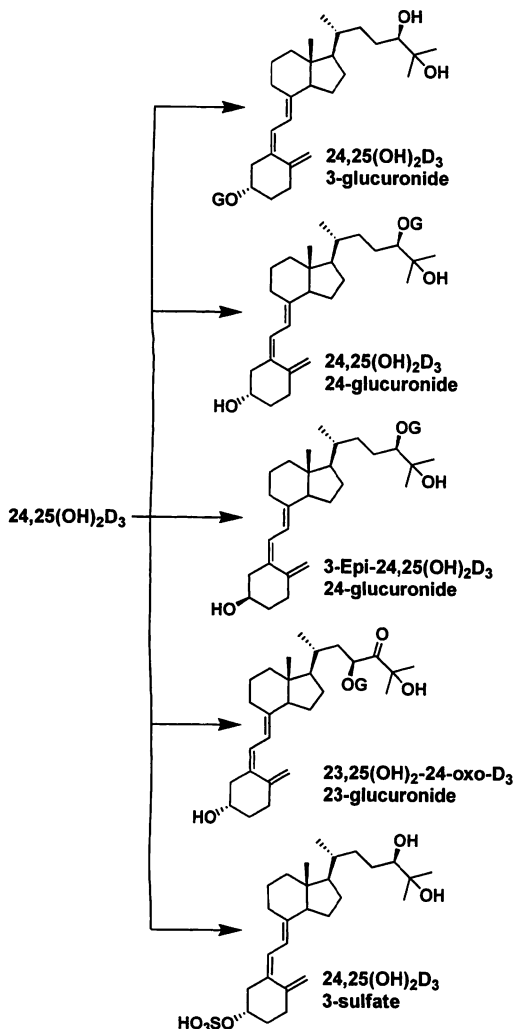


Fig. 3 Metabolic pathway of 24,25(OH)₂D₃

は、ESI-MS/MSにおいて1,25(OH)₂D₃の合成アナログのPTAD付加体が、特徴的なプロダクトイオン (m/z 314)を生成することに着目し定量法を開発したが¹⁷⁾、定量下限は数百 pgであり、内因性D代謝物の定量には不十分であった。また、合成Dアナログを電気陰性度の高いフッ素原子を導入したCookson型試薬、4-ペンタフルオロベンジル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン (4-pentafluorobenzyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione: PFBTAD, Fig. 1)との付加体に導き、LC/パーティクルビーム (particle beam)-電子捕獲負イオン化-MSにより定量した報告もある¹⁸⁾。しかし、これらの方法はそれぞれのイオン化法による制約を受け、前者ではキャピラリーLCを、後者では順相LCを使用しており、負荷量の問題や生体試料が高極性の化合物を含む複雑なマトリックスであることを考慮すると、必ずしも実用的ではない。一方、ESIと並んでLC/MSのイオン化法としては用いられているAPCIは、非抱合型D化合物のようなイオンの中性の化合物に適しており、流量1 ml/min程度のコンベンショナルな逆相LC条件が使用できる

利点を有している。また、APCIはESIと比べ、共存物質による測定対象のイオン化抑制の問題が少ないことも定量分析には有利である。さらに正イオン検出のAPCIでは、酸素や窒素等のプロトン親和性原子を多く有する化合物のイオン化効率が高いことが知られている。このことはAPCI-MSにおいて、Cookson型試薬による誘導体化がD化合物の検出感度を大きく上昇させることが可能なことを意味している。すなわち、本試薬の基本構造 (1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン) 自体がプロトン親和性原子に富んでおり、その4位置換基にも同原子を多く有する構造のものを用いれば、更なる高感度化が期待できる。

3.2.2 APCI-MS用Cookson型試薬の選択 そこで著者らは、25(OH)D₃をモデル化合物に選択し、イオン化効率に対する各種Cookson型試薬による誘導体化の効果を検討した。試薬としては、PTADのほかに蛍光ラベル化試薬として開発され、その構造内に酸素及び窒素原子を多く有する4-[4-(6-メトキシ-2-ベンゾキサゾリル)フェニル]-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン {4-[4-(6-methoxy-2-benzoxazolyl)phenyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione: MBOTAD⁸⁾及びDMEQTAD⁹⁾を用いた (Fig. 1)。上述のように本誘導体化反応では6位のエピマーが生成するが、感度比較には主成体である6S体を用いた (6R:6S=約2:7)。LCはカラムにJ'sphere ODS H-80 (150×4.6 mm i.d.)を、移動相にメタノールあるいはアセトニトリルと水の混合溶媒を流量1 ml/minで用い、その混合比は各種化合物の保持時間が約5分となるように調製した。25(OH)D₃ (誘導体化前)及びPTAD誘導体はメタノール系で、MBOTAD及びDMEQTAD誘導体はアセトニトリル系でより高感度な応答を示した。MS条件 (加熱キャピラリー温度、霧化部温度など)も誘導体ごとに最適化した。それぞれの誘導体の検出限界 (シグナル/ノイズ比=3)から見積もった相対的な感度をTable 1に示した。誘導体化前を1とするとき、期待どおりPTAD, MBOTAD, DMEQTADの順にプロトン親和性原子の導入数に応じて感度の向上が認められた。特にDMEQTAD誘導体は、ほぼプロトン付加分子イオンのみを与え、高感度化に適していた。さらにこのイオンをプリカーサーイオンとするMS/MSを試みたが、高いエネルギーを用いてフラグメンテーションを起こさせるよりも、低エネルギーで衝突活性化後、残存する同イオンをモニターする方法がノイズの低減効果が大きく、その結果、DMEQTAD誘導体の検出限界は12.5 fmolと、誘導体化前と比較して24倍の高感度化が達成された。そこで、以降の研究には本試薬を用いることとした。なお、本結果を基にヒト血しょう中25-ヒドロキシビタミンD₂及び25(OH)D₃の同時定量法を開発したが、本法はわずか20 μlの血しょう試料を用い、前処理は有機溶媒抽出のみの簡便で感度に優れるものであった¹⁹⁾。

Table 1 Effect of derivatization for detection responses

Compound	Characteristic ions (Monitoring ions, sum)	Limit of detection ^{a)} (Relative sensitivity)
25(OH)D ₃	401 [M+H] ⁺ , 383 [401-H ₂ O] ^{+ b)} and 365 [401-2H ₂ O] ⁺	300 fmol (1)
PTAD derivative	576 [M+H] ⁺ and 558 [576-H ₂ O] ^{+ b)}	100 fmol (3)
MBOTAD derivative	723 [M+H] ^{+ b)} and 705 [723-H ₂ O] ^{+ b)}	30 fmol (10)
DMEQTAD derivative	746 [M+H] ^{+ b)}	20 fmol (15)
DMEQTAD derivative (MS/MS)	746 [M+H] ^{+ b)}	12.5 fmol (24)

a) Per injection, signal to noise ratio = 3. b) Base ion. (Adapted from reference 19 with permission.)

3・2・3 活性型 D₃ 製剤の血中濃度測定の開発 D 研究における従来からの重要課題の一つに、1 α -ヒドロキシビタミン D₃ [1 α (OH)D₃] の体内挙動の解明が挙げられる。本薬物は活性型 D₃ のプロドラッグ [肝で 25 位が水酸化されて 1 α ,25(OH)₂D₃ に変換される] として 20 年以上も前に発売され、現在も主に骨粗鬆症や腎性骨異栄養症の治療薬 (アルファロール[®]: 中外製薬, ワンアルファ[®]: 帝人など) として用いられているが、その体内動態はほとんど解明されていない。これは 1 α (OH)D₃ の投与量が 1 日あたり数 μ g 以下と少なく血中濃度が極めて低いこと、VDR への親和力が極めて弱く、また特異抗体も得られないため、これらを用いるアッセイ系が構築できないことなどによる。一方、LC/MS においても種々のイオン化法におけるイオン化効率が他の D 化合物に増して低く、実用的な感度が得られない。

そこで先の DMEQTAD 化に加え、APCI-MS への応答を更に増大させる目的で水酸基をアセチル化したところ、検出限界は 6.3 fmol [1 α (OH)D₃ として 2.5 pg, カラム: J'sphere ODS H-80 (150 \times 4.6 mm i.d.), 移動相: アセトニトリル-水 (23 : 2), 流量: 1 ml/min] と誘導体化前に比べ 80 倍もの高感度化に成功した。なお、1 α (OH)D₃ と Cookson 型試薬との反応では、6R 体がやや優先して生成するため (6R : 6S = 約 7 : 5), 定量には本エピマーを用いた。また、本研究においてもノイズの低減を目的に、低エネルギーでの MS/MS (プリカーサーイオン及びモニタリングイオン: m/z 830 [M+H]⁺) を採用した。血しょう試料をアセトニトリルで除タンパク後、OASIS HLB 及び Bond Elut Si カートリッジで精製して 1 α (OH)D₃ 画分を得、誘導体化反応に付した。前処理操作における回収率は良好 (約 60%) で、誘導体化率も定量的であった。次いで [22,22,23,23-²H₄]-1 α (OH)D₃ を内標準物質に用いる同位体希釈 LC/MS/MS を開発したが、血しょう 1 ml を用いるとき 25 pg/ml の 1 α (OH)D₃ の定量が可能であった [Fig. 4(a)]. 本法を 4 μ g の 1 α (OH)D₃ カプセルを経口投与した健康人男性の血中濃度測定へ適用したところ、投与後 5 時間及び 7 時間の薬物の定量が可能であった [Fig. 4(b)]²⁰⁾。これは本薬物のヒトにおける体内動態が示された

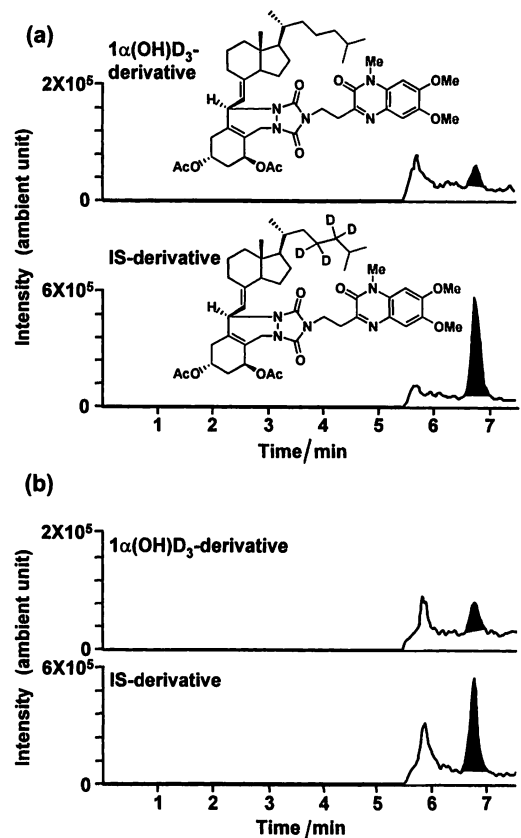


Fig. 4 Mass chromatograms of derivatized 1 α (OH)D₃ and internal standard (IS) in human plasma

(a) blank plasma spiked with 1 α (OH)D₃ (25 pg/ml) and IS (400 pg/ml), (b) plasma sample from volunteer dosed with 4 μ g of 1 α (OH)D₃ (7 h after the administration)

最初の例であった。

4 結 言

最近、D 研究においては、その多彩な作用の一部を活性型 D 以外の代謝物が担っている可能性が示唆され、膜受容体の存在などとともに注目されている²¹⁾。このような作用メカニズムの解明には高感度で特異的な分析法が必須であり、LC/MS が有力な手段となることは間違いない。LC/MS は日進月歩の進化を遂げており、GC/MS に劣ら

ない感度を有する機種も登場している。また, GC/MS と比較して LC/MS の最大の特長は誘導体化を伴わずに直接分析できる点であるが, 万能ではない。本研究では LC/MS においても誘導体化による工夫で, より豊富な構造情報が得られること, 及び高感度化が達成されることを明らかとした。すなわち, LC/MS への誘導体化の導入は, そのポテンシャルを一層引き出すための一つの手段として重要である。

著者らの研究は文部科学省科学研究費, 金沢大学特別研究プロジェクト経費及び中外製薬株式会社からの研究助成を受けて行われたものである。

文 献

- 1) H. L. J. Makin, G. Jones, M. J. Calverley: "Steroid Analysis", Edited by H. L. J. Makin, D. B. Gower, D. N. Kirk, p. 562 (1995), (Blackie Academic and Professional, London).
- 2) 東 達也, 島田和武: 薬学雑誌, **119**, 898 (1999).
- 3) K. Shimada, K. Mitamura, T. Higashi: *J. Chromatogr. A*, **935**, 141 (2001).
- 4) 松崎和恵, 溝奥康夫, 鈴木 隆, 木村寛三: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 537 (1996).
- 5) M. Ishigai, Y. Asoh, K. Kumaki: *J. Chromatogr. B*, **706**, 261 (1998).
- 6) A.-M. Kissmeyer, K. Sonne, E. Binderup: *J. Chromatogr. B*, **740**, 117 (2000).
- 7) M. Ishigai, Y. Ishitani, K. Kumaki: *J. Chromatogr. B*, **704**, 11 (1997).
- 8) K. Shimada, T. Mizuguchi: *J. Chromatogr.*, **606**, 133 (1992).
- 9) M. Shimizu, S. Kamachi, Y. Nishii, S. Yamada: *Anal. Biochem.*, **194**, 77 (1991).
- 10) T. Higashi, M. Horike, R. Kikuchi, K. Shimada: *Steroids*, **64**, 715 (1999).
- 11) T. Higashi, K. Miura, J. Kitahori, K. Shimada: *Anal. Sci.*, **15**, 619 (1999).
- 12) T. Higashi, K. Miura, R. Kikuchi, K. Shimada, H. Hiyamizu, H. Ooi, Y. Iwabuchi, S. Hatakeyama, N. Kubodera: *Steroids*, **65**, 281 (2000).
- 13) T. Higashi, A. Ogasawara, K. Shimada: *Anal. Sci.*, **16**, 477 (2000).
- 14) T. Higashi, A. Ogasawara, K. Shimada: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **23**, 2475 (2000).
- 15) M. Kamao, S. Tatematsu, G. S. Reddy, S. Hatakeyama, M. Sugiura, N. Ohashi, N. Kubodera, T. Okano: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **47**, 108 (2001).
- 16) A. S. Weiskopf, P. Vouros, J. Cunniff, E. Binderup, F. Bjorkling, L. Binderup, M.-C. White, G. H. Posner: *J. Mass Spectrom.*, **36**, 71 (2001).
- 17) B. Yeung, P. Vouros, M.-L. Siu-Caldera, G. S. Reddy: *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1099 (1995).
- 18) K. Wang, P. P. Davis, T. Crews, L. Gabriel, R. W. Edom: *Anal. Biochem.*, **243**, 28 (1996).
- 19) T. Higashi, D. Awada, K. Shimada: *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 738 (2001).
- 20) T. Higashi, D. Awada, K. Shimada: *J. Chromatogr. B*, **772**, 229 (2002).
- 21) A. W. Norman, H. L. Henry, J. E. Bishop, X. D. Song, C. Bula, W. H. Okamura: *Steroids*, **66**, 147 (2001).

要 旨

生体内のビタミン D (D) 化合物の分析は, 臨床, 栄養診断あるいは新薬の開発上重要であり, その体液中レベルや熱安定性などを考慮すると, 方法論として高速液体クロマトグラフィー/質量分析法が有望視される。しかし, 本法はイオン化法がソフトであるため期待したほどの構造情報が得られないことや, D 化合物のイオン化効率が低く実用的な感度が得られないなどの問題を抱えている。そこで著者らは, D 化合物の *s*-シス-ジエンと選択的に反応する Cookson 型試薬に着目し, これを用いる誘導体化によりこれらの問題の解決を試みた。すなわち, 構造解析及び高感度検出の両面からその有用性を検討し, 本誘導体化が代謝部位の決定に有益なプロダクトイオンを与えること及び D 化合物のイオン化効率を数十倍増加させることを見いだした。これらの知見を基に D の新規代謝経路の解明及び超微量活性型 D 製剤の血中濃度測定に成功した。